

“HEARING THE GENOME”

WHEN EVERYTHING IS POSSIBLE...

DRA. VIVIANA DALAMÓN, Ph.D.

INVESTIGADORA ADJUNTA
INSTITUTO INGEBI-CONICET
ARGENTINA

vivalamon@gmail.com

**Hipoacusias Sindrómicas y No Sindrómicas.
Su estudio genético y diagnóstico molecular.**

OBJETIVO:

**Podemos analizar CUALQUIER gen conocido.
Desde UNO en particular a TODOS los genes
relacionados con Hipoacusia.**

La pregunta clave es: qué estudio? Para qué?

Sli.do

QUÉ ES LO QUE QUEREMOS CONOCER AL REALIZAR EL ESTUDIO GENÉTICO?

✓ Causa:

- Por qué mi hijo es hipoacúsico si no hay antecedentes en la familia?
- Por qué todos en mi familia son hipoacúsicos?
- Puede otro hijo ser hipoacúsico?

✓ Tratamiento:

- Puedo “predecir” la aparición de la patología y su severidad?
- Puedo predecir la evolución?
- Puedo predecir la respuesta al implante coclear? O al menos dimensionar las expectativas del paciente y su familia?
- Se trata de una neuropatía genética?

QUÉ ES LO QUE QUEREMOS CONOCER AL REALIZAR EL ESTUDIO GENÉTICO?

✓ Monitoreo:

- Identificar enfermedades genéticas **tempranamente**, por lo que su tratamiento puede comenzar lo más rápidamente posible.
- Un resultado negativo puede eliminar la necesidad de monitoreos constantes.
- Se trata de una **forma sindrómica** aún no diagnosticada? Es éste el síndrome?

✓ Decisiones:

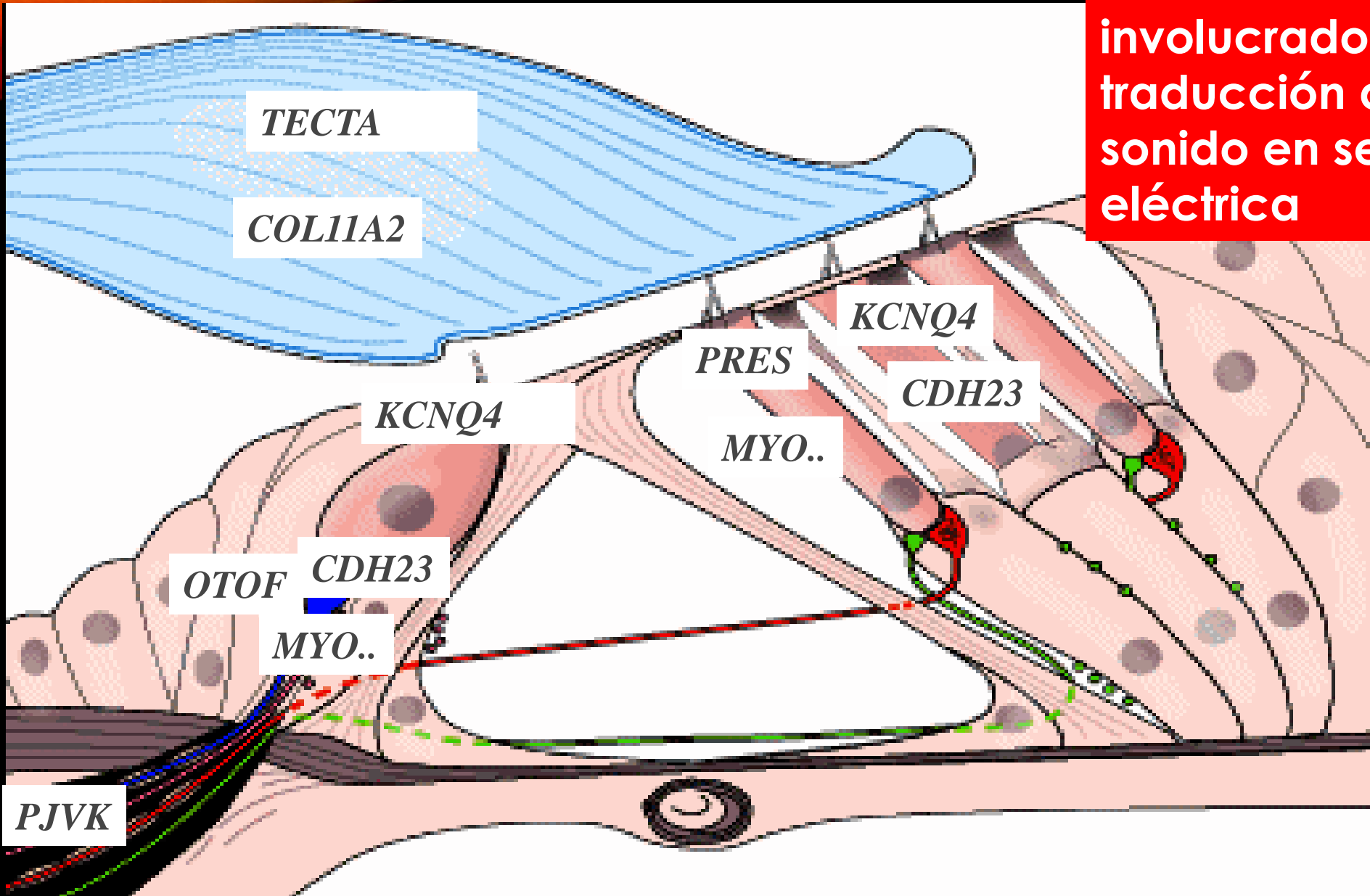
- Puede ayudar a la familia y al profesional a tomar decisiones sobre el control y el manejo de la salud del afectado y sus parientes.

**Hipoacusias Sindrómicas y No Sindrómicas.
Su estudio genético y diagnóstico molecular.**

OBJETIVO:

- Encontrar el GEN causal de la patología.
- Entender el desarrollo de la hipoacusia.
- Predecir su evolución y/o respuesta al tratamiento.

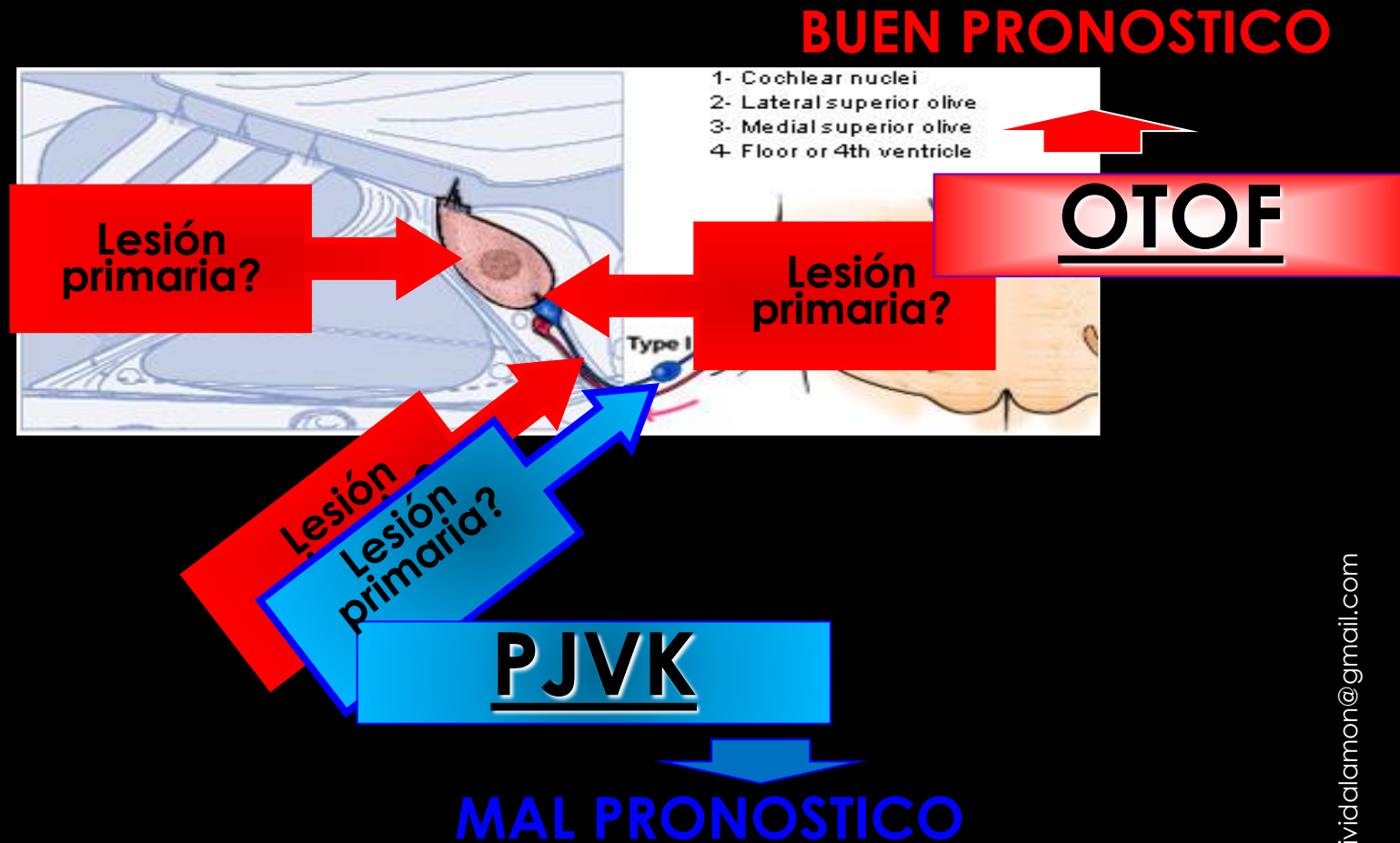
Más de 100 Genes involucrados en la traducción del sonido en señal eléctrica



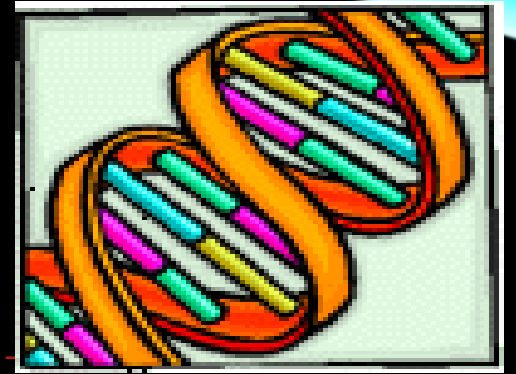
BRINDAR INFORMACIÓN SOBRE LA RESPUESTA AL IMPLANTE DE CÓCLEA.



Los casos más estudiados:
Neuropatía auditiva



HIPOACUSIAS



*clínicamente heterogéneas

**Incidencia
1/500-1000**

**Cuáles son
genéticas?**

**Causas NO genéticas
50%**

**Causas genéticas
50%**

Potencialmente cualquier paciente es **CANDIDATO** al estudio genético.
Es **FUNDAMENTAL** la historia clínica completa.

30%
Sindrónica

400 síndromes

70%
NO sindrónica

Más de **100 genes**

Causas NO genéticas

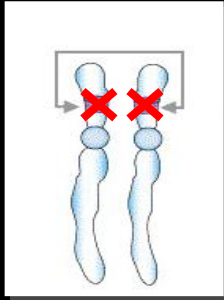
Causas genéticas

La mayoría de los casos son causados por mutaciones puntuales en UN gen.

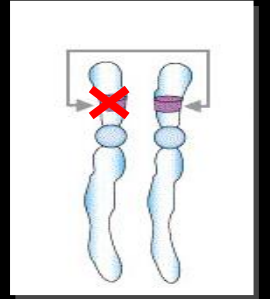
Hereditary Hearing Loss website: [http:// hereditaryhearingloss.org](http://hereditaryhearingloss.org)

70%
NO sintromica

75%
Autosomica
RECESIVA



20-25%
Autosomica
DOMINANTE

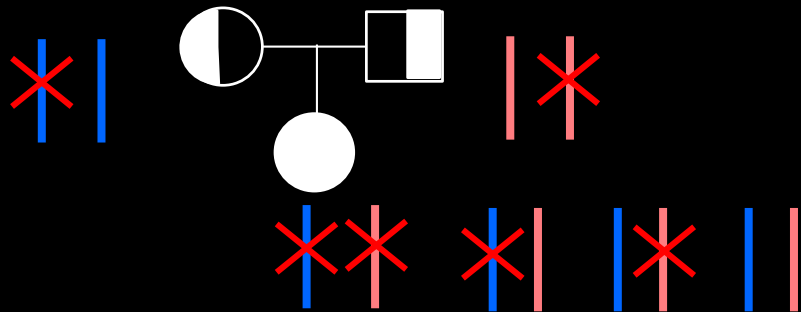


1-5% Ligada al cromosoma X
y mitocondrial

Cómo se presentan en el consultorio?

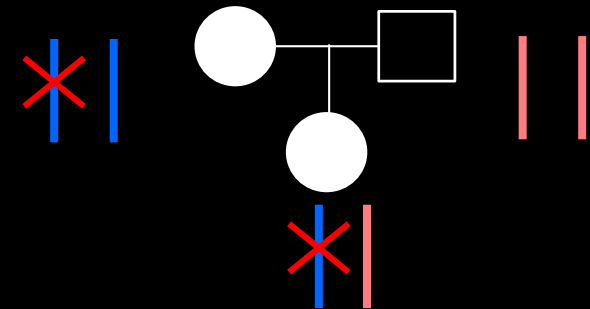
Con padres SANOS

Es probable que haya portadores



CON ANTECEDENTES

Es probable que haya mas afectados en la flia



Hip. PRELINGUAL
severa-profunda.

HAY EXCEPCIONES!!!

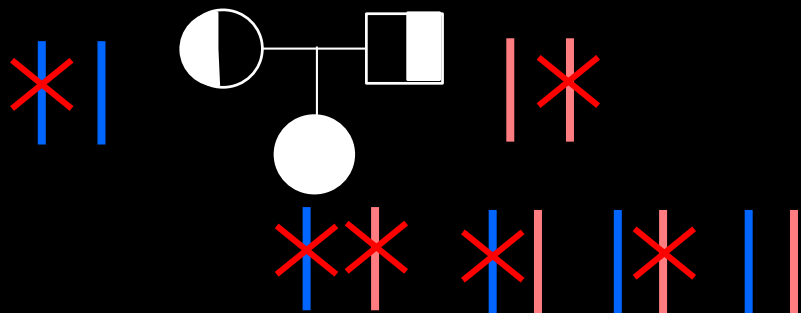
Hip. POSTLINGUAL
progresiva-moderada.

Cómo se presume será la severidad y edad de aparición?

Cómo se presentan en el consultorio?

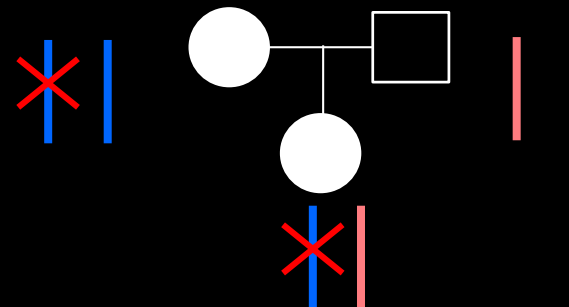
Con padres SANOS

Es probable que haya portadores



CON ANTECEDENTES

Es probable que haya varios afectados en la flia



CONSULTA GENÉTICA: ALGORITMO DE ESTUDIO



**Estudios
Clásicos**

**Estudio de Última
generación**

ESTUDIO TODOS LOS GENES? UNO?

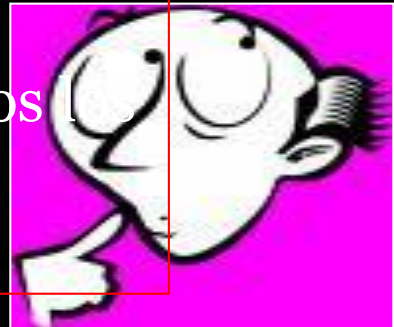
Se decide un GEN CANDIDATO
y se secuencia. Se buscan
mutaciones reportadas

POR QUÉ TÉCNICA?

Se secuencian varios o todos los
genes relacionados

POR DONDE EMPIEZO?

Sli.do



CONSULTA GENÉTICA: ALGORITMO DE ESTUDIO



**Estudios
Clásicos**

Se decide un GEN CANDIDATO
y se secuencia. Se buscan
mutaciones reportadas

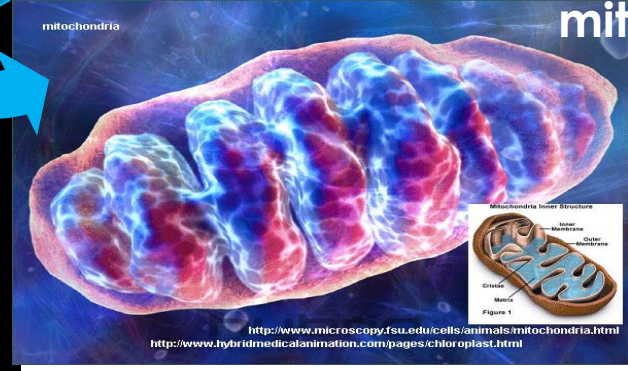
Genoma

ADN nuclear



ADN

mitochondrial



Material de partida: sangre periférica-saliva



AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT
AGTCCGCGAATACAGGCTCGGT



PRIMER ESTUDIO: MUTACIONES CONOCIDAS FRECUENTES



Hipoacusias
NO sindrómicas



75% Autosómica
recesiva



GJB2 (Conexina 26)

GJB6 (Conexina 30)

Q829X en OTOF



3^{er} causa en España

MT-RNR1

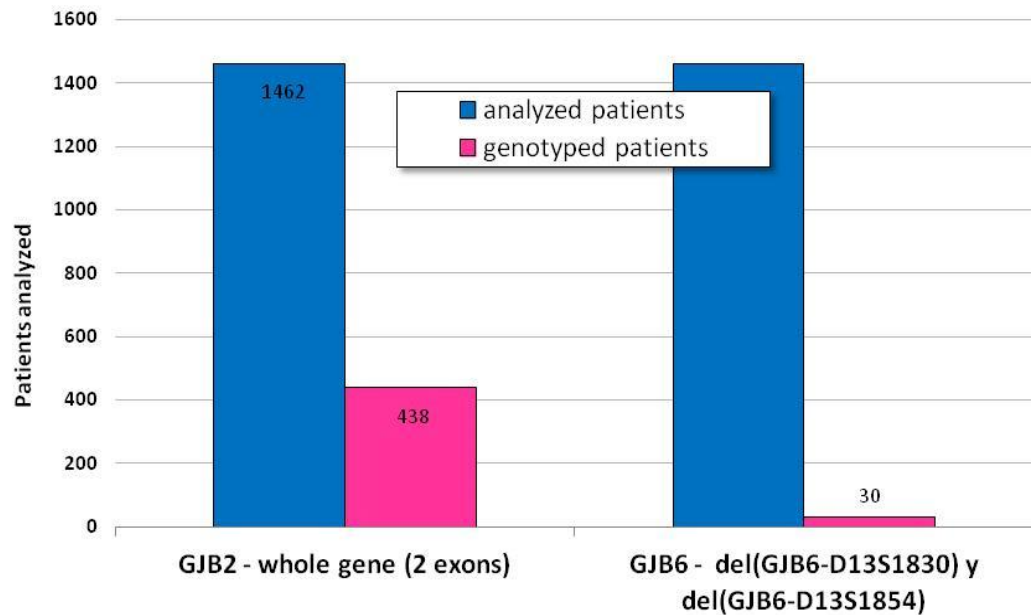


3 mutaciones
Aminoglucósidos

**Diagnostican
10-30% de los
pacientes**

PRIMER ESTUDIO: RASTREO INICIAL

Se estudiaron **~1500** pacientes



~30% de los pacientes fueron diagnosticados analizando los

4 genes incluidos

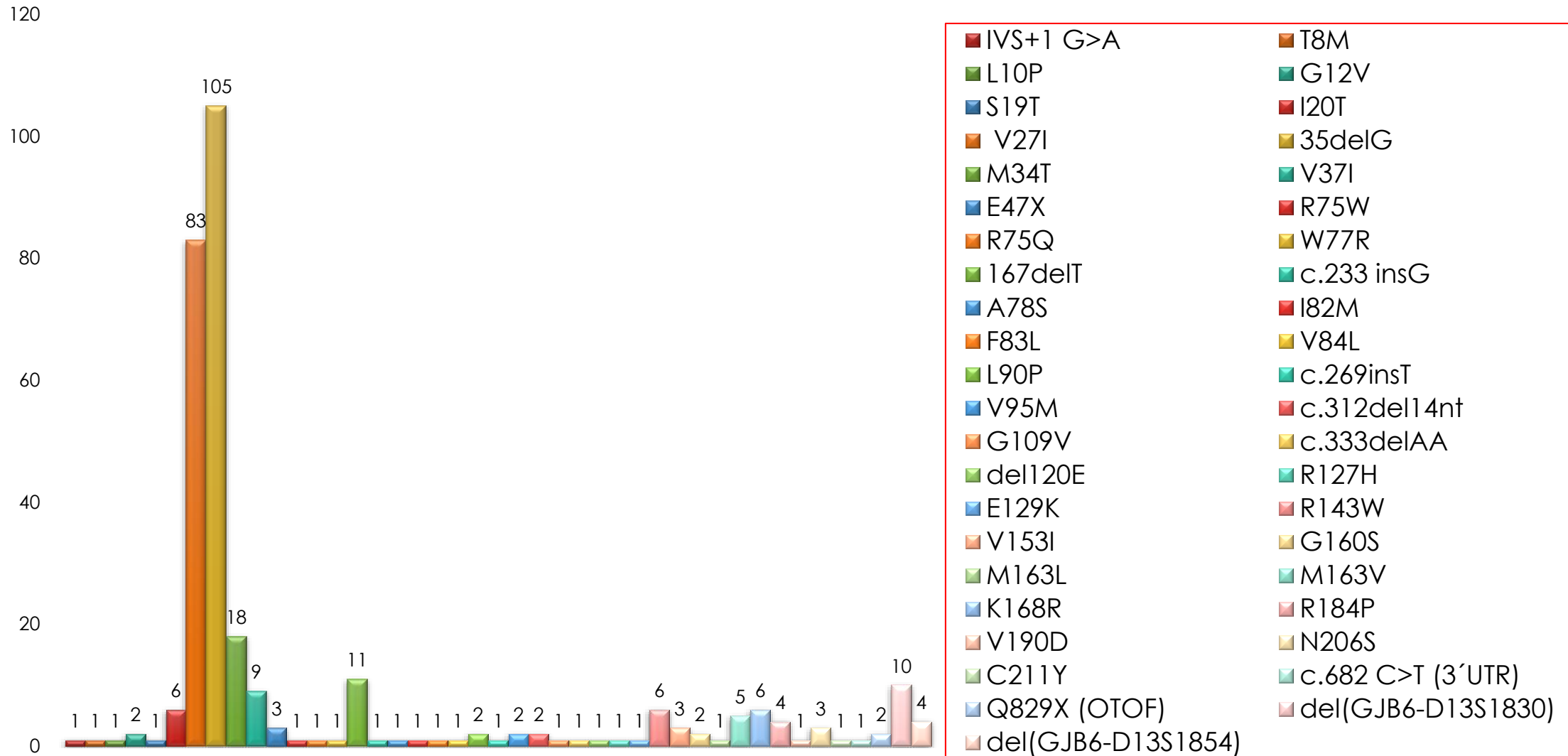
GJB2

GJB6

OTOF

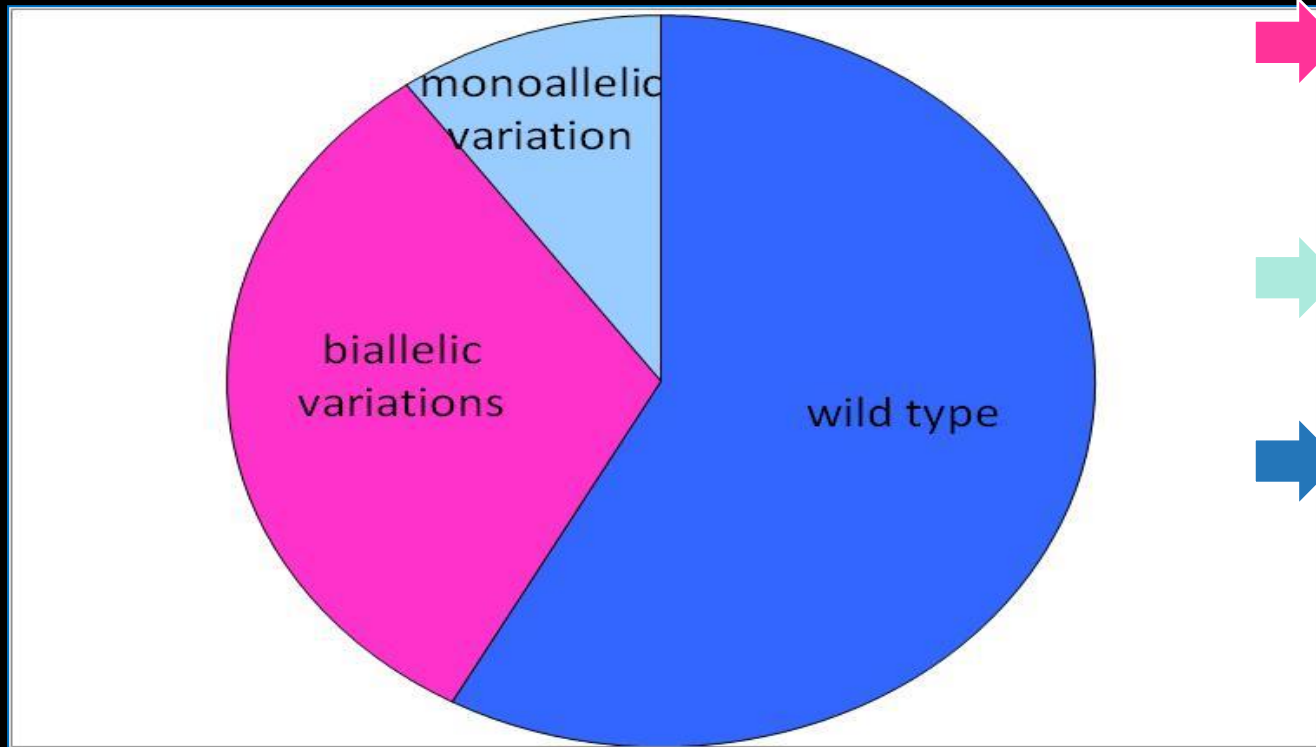
MT-RNR1

En el laboratorio detectamos 43 VARIANTES GENÉTICAS en los genes *GJB2* y *GJB6*



Es suficiente?

Screening de mutaciones en los genes GJB2 y GJB6 por secuenciación y PCR-gap.



25-30% mutaciones en GJB2/GJB6

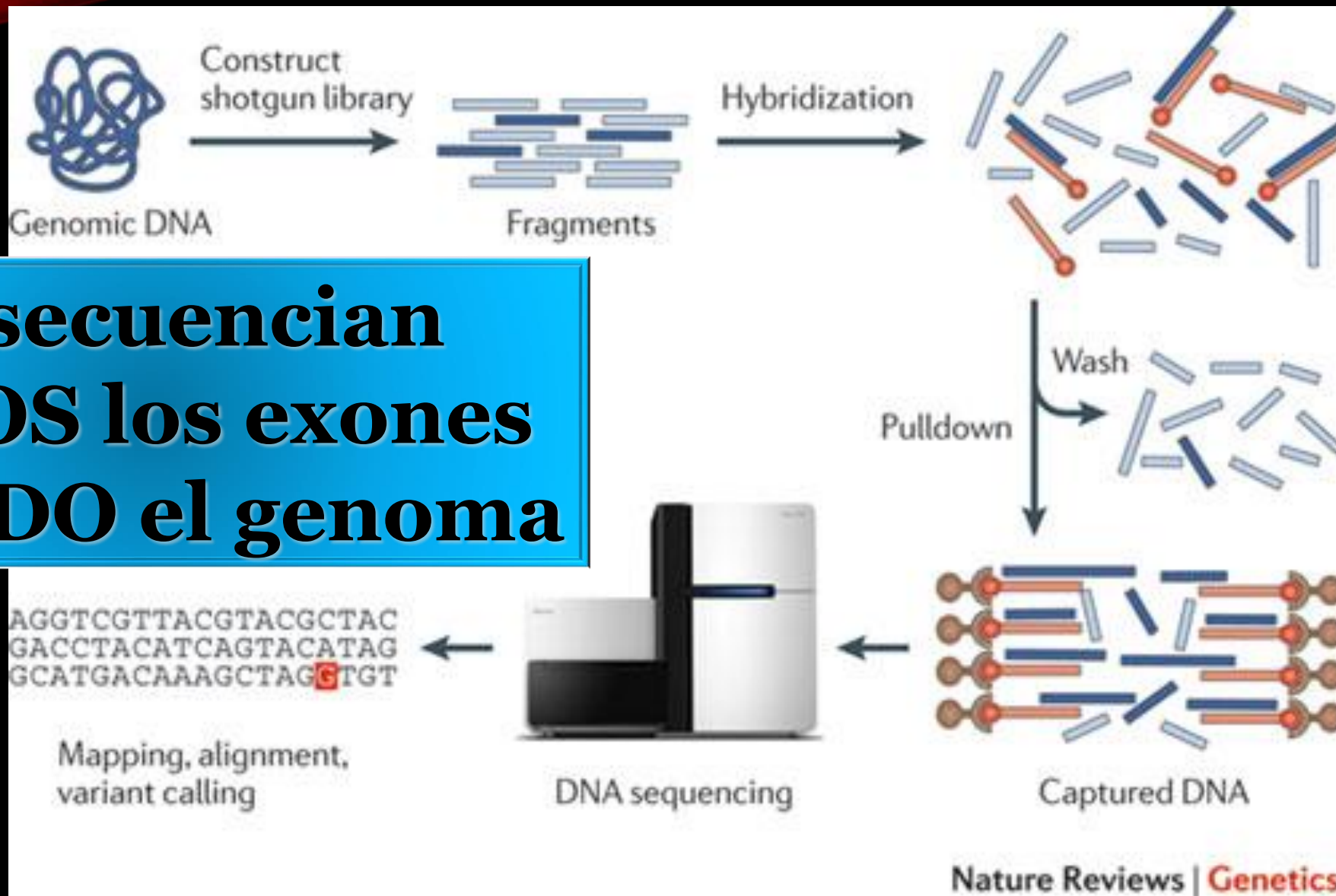
5-10% portadores

70% sin diagnosticar

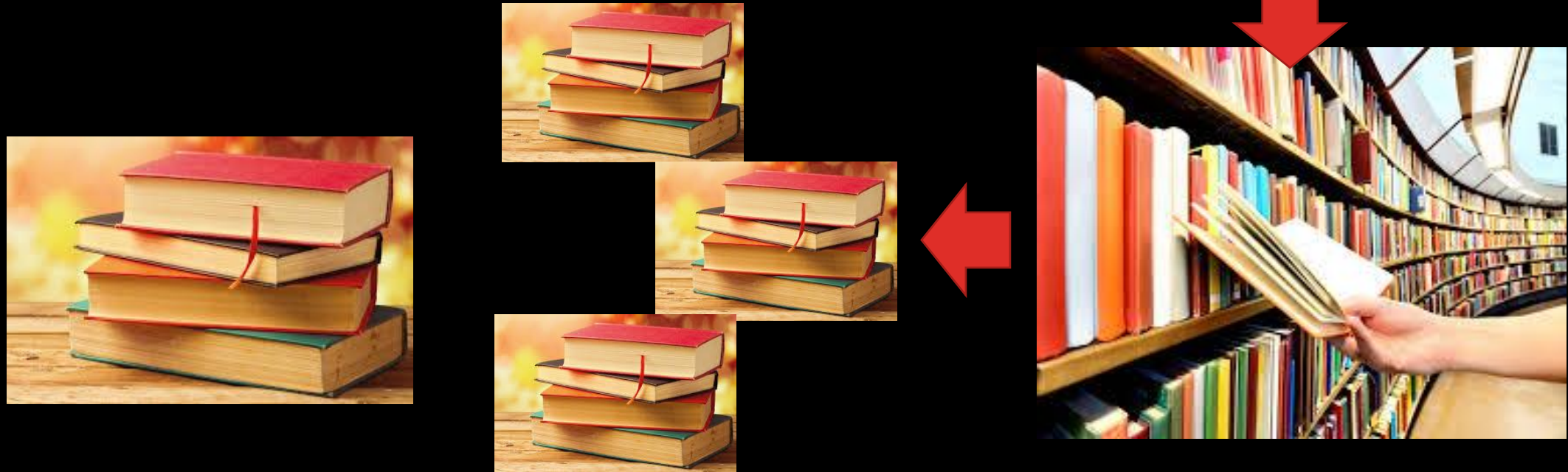
Exoma!

Whole exome sequencing (WES)

Se secuencian TODOS los exones de TODO el genoma



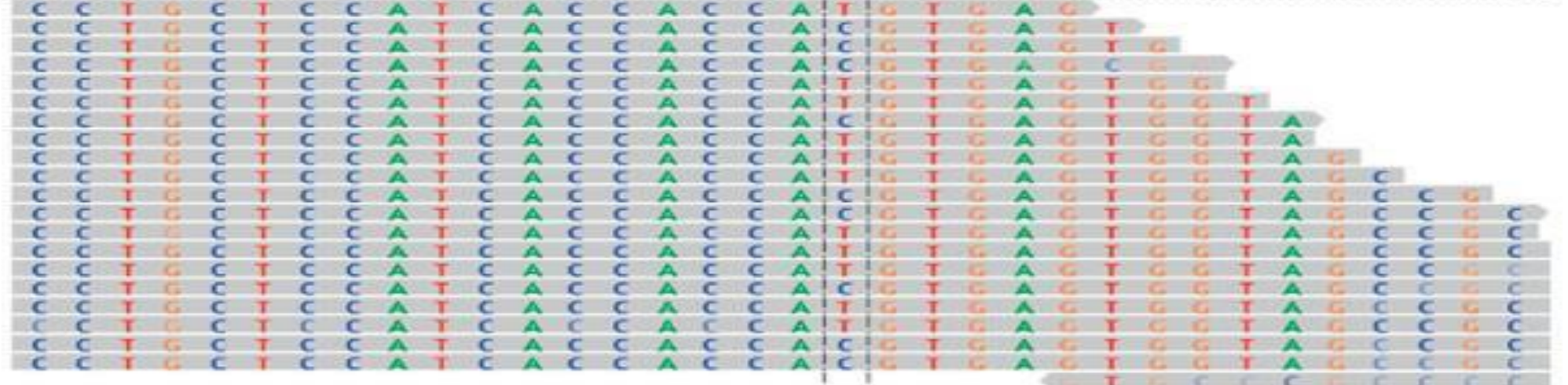
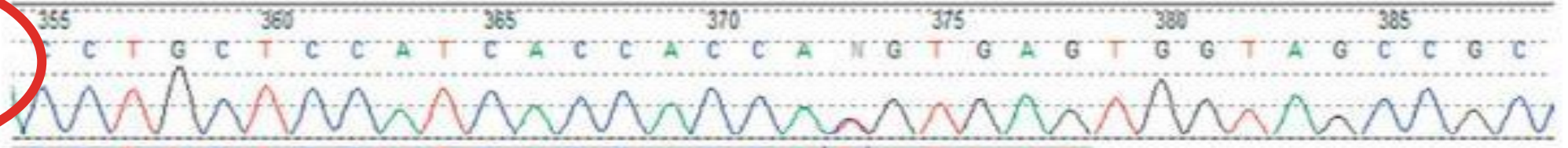
SECUENCIACIÓN EXOMICA?



De toda la información recibida , se analizan los **genes relacionados con HIPOACUSIA.**

Si la mutación esta en OTRO gen... Se tiene **TODA la información** para seguir buscando todas las veces que sea necesario...

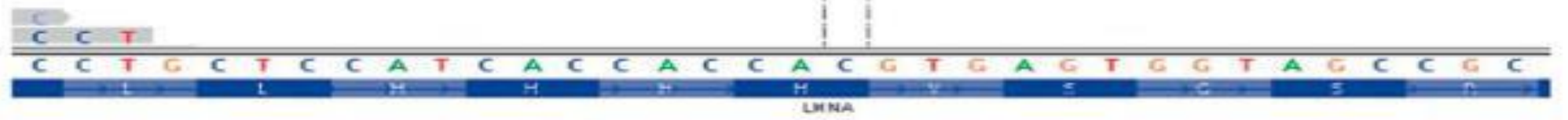
Sanger



Heterozygous C>T
 Total coverage = 20
 C = 9
 T = 11
 Allelic ratio = 0.55

Las variantes DEBEN validarse por Secuenciación de Sanger!!

Reference



**GENES
Autosómicos
Recesivos (DFNB)**

ADCY1 BDP1 BSND CABP2
CDC14A CDH23 CIB2 CLDN14
CLIC5 COL11A2 DCDC2 ELMOD3
EPS8 EPS8L2 ESPN ESRRB FAM65B
GIPC3 GPSM2 GRXCR1 GRXCR2
ILDR1 KARS LHFPL5 OTOA OTOF
OTOG OTOGL PCDH15 PNPT1
PTPRQ RDX ROR1 S1PR2
SERPINB6 SLC22A4 SLC26A4
SLC26A5 STRC SYNE4 TBC1D24
TMEM132E TMIE TMPRSS3 TPRN
TRIOBP TSPEAR MET MSRB3
MYO15A MYO3A MYO6 NARS2
LRTOMT COMT2 MARVELD2
LOXHD1 USH1C WBP2 WHRN
DFNX5 AIFM1 MPZL2 LARS2
(70 genes)

GJB2
GJB6
MYO7A
COL11A2
TMC1
TECTA

PRPS1
POU3F4
SMPX
COL4A5
AIFM1

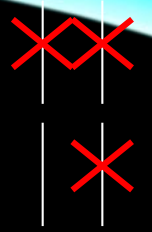
**GENES
Autosómicos
Dominantes (DFNA)**

CRYM DIAPH1 KCNQ4 GJB3
MYH14 CEACAM16 WFS1 COCH
EYA4 MYO7A COL11A2 POU4F3
MYH9 ACTG1 MYO6 SIX1 SLC17A8
GRHL2 NLRP3 P2RX2 CCDC50
MIRN96 TJP2 TNC SMAC DIABLO
TBC1D24 CD164 OSBPL2 HOMER2
MCM2 KITLG DMXL2 DFNA48
MYO1A AUNA1 DIAPH3 DFNX1
DFN2 PRPS1 DFNX2 DFN3 POU3F4
DFNX4 DFN6 SMPX DFNX5 AIFM1
COL4A6 LMX1A NEDD4 NEDD4L
NEFH
(59 genes)

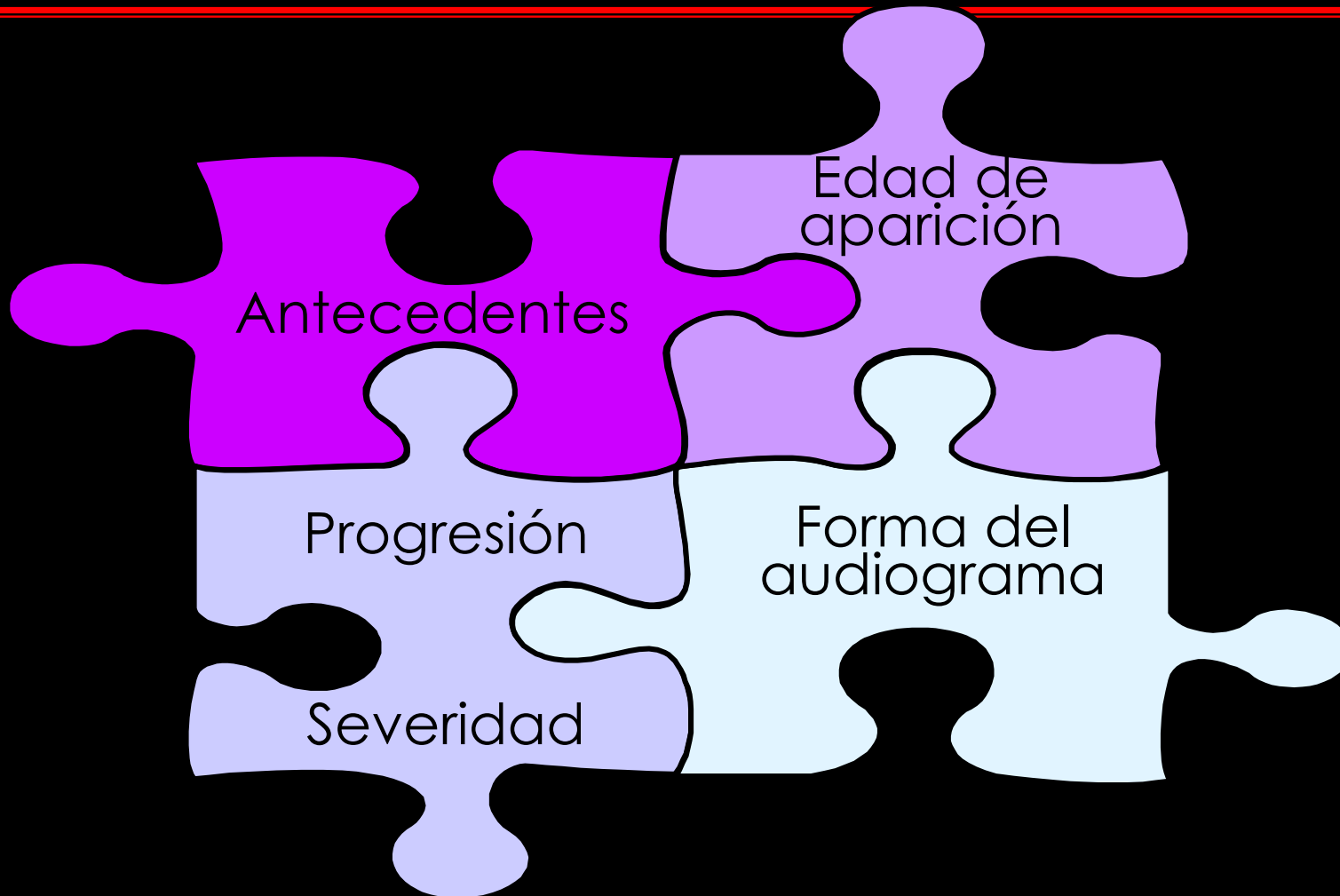
Ligados al X (DFNX)

Genes de herencia Autosómica recesiva: 70

Genes de herencia Autosómica dominante: 55



HISTORIA CLINICA COMPLETA



WHOLE EXOME SEQUENCING (WES)

WES ~ 85000
variantes

↓

Cómo encontrar
la/las mutaciones
causales?



WES
~85000

1-7 Variantes



FILTRADO

**150 GENES
ESPECIFICOS
SORDERA**

TIPO DE HERENCIA
Dominante
Recesivo
Ligado al X

TIPO DE VARIACIÓN
Missense / nonsense
Frameshift
Splicing

**FRECUENCIA DE LA en
POBLACION "NORMAL"**
<1%
5 bases de datos distintas

ANÁLISIS

**Qué le hace la mutación
a la proteína?
7 predictores
bioinformaticos**

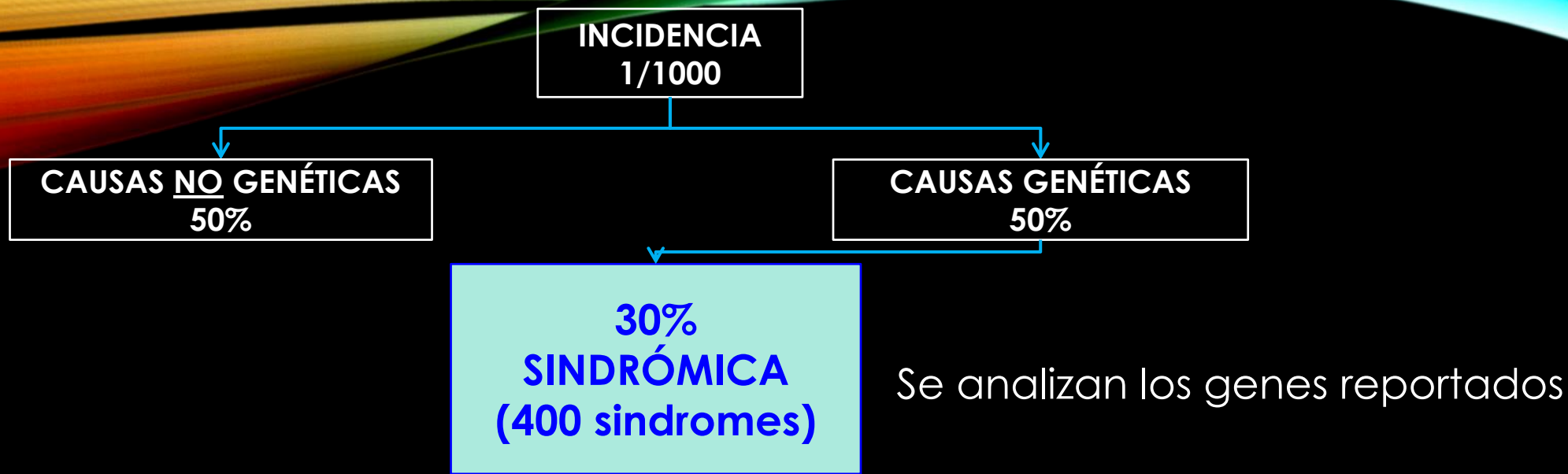
**Qué se sabe ya de esa
mutación? Alguien la
reportó antes?**

**Se correlaciona lo que
encontré con la clínica?**

**Segregación en la
familia**

CASOS





Síndromes

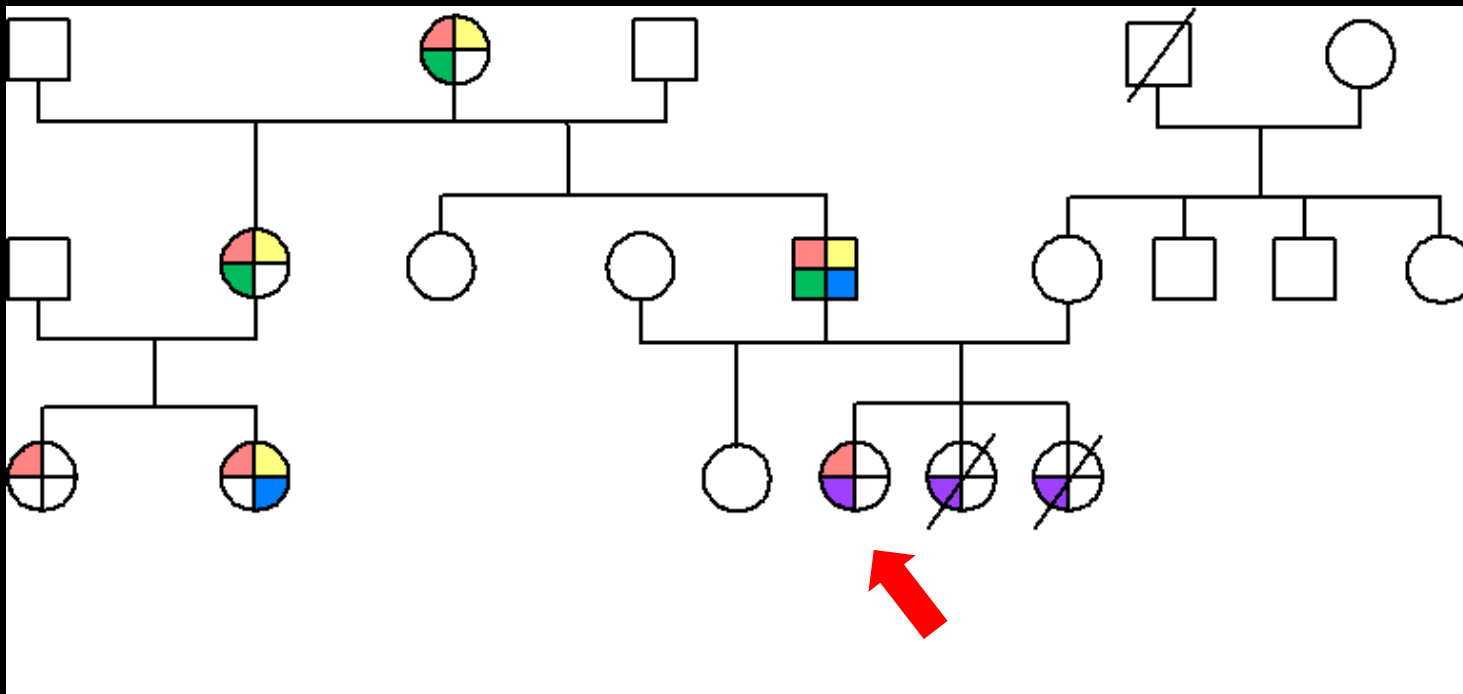
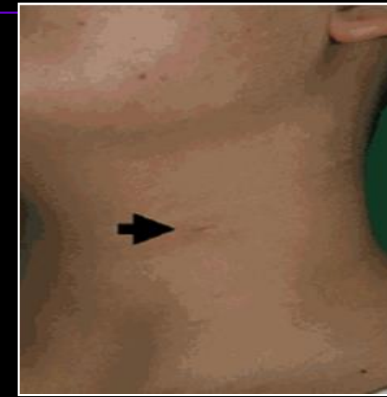
Usher (retinitis)
 Pendred (bocio)
 BOR (alteraciones renales y braquiales)
 Jervell and Lange Nielsen (QT largo)
 Stickler (articulaciones, vista)
 Treacher Collins
 Alport (renal)
 Alstrom (retinitis, obesidad, diabetes)
 KID (dermatológico)
 Waardenburg

Genes

CDH23-CIB2-CLRN1-GPR98-MYO7-PDZD7-PCDH15-USH1C-USH1G-USH2A-WHRN-HARS
 SLC26A4-FOXI1-KCNJ10
 EYA1-SIX1-SIX5
 KCNE1-KCNQ1
 COL2A1-COL9A1-COL9A2-COL11A1-COL11A2-LOXL3
 TCOF1- POLR1C- POLR1D
 COL4A5-COL4A3-COL4A4
 ALMS1
 GJB2
 PAX3-MITF-SAIN2-KITLG-SOX10- EDN3- EDNRB

CASO 1: SÍNDROME DE BOR

- Branchio-oto-renal syndrome (1:40.000)
- Autosómica Dominante
- Afecta cuello (fístulas), oído externo (PITS)
- Alteraciones de Oído medio e interno
- Malformaciones renales (hipoplasia leve-agenesia bilateral)
- Clínicamente es muy heterogénea (expresión intrafamiliar variable)



- Hipoacusia
- Fístulas cervicales
- Fositas preauriculares
- Patología renal
- Trastornos del habla
Paladar hendido

CASO 1: SÍNDROME DE BOR

Genes EYA1 - SIX 1 - SIX5

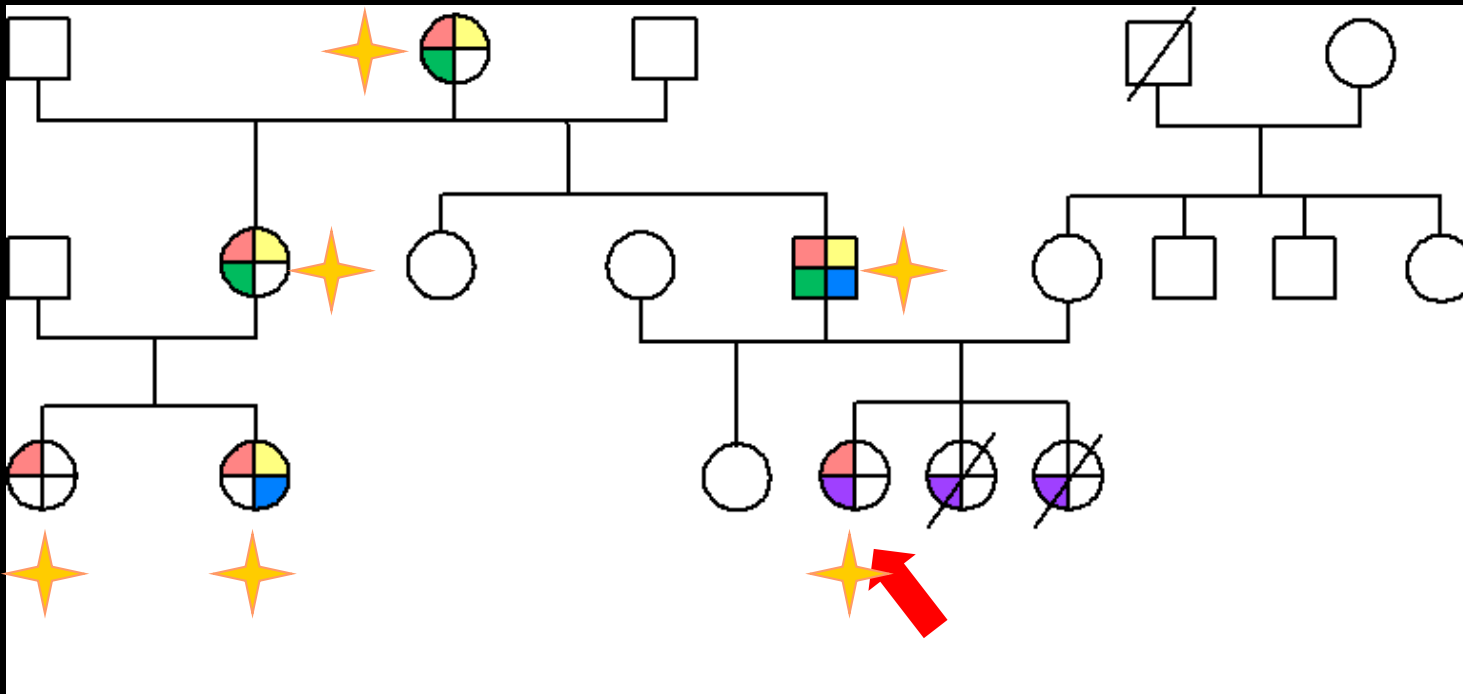


•40% de los pacientes.

SECUENCIACIÓN EXOMICA



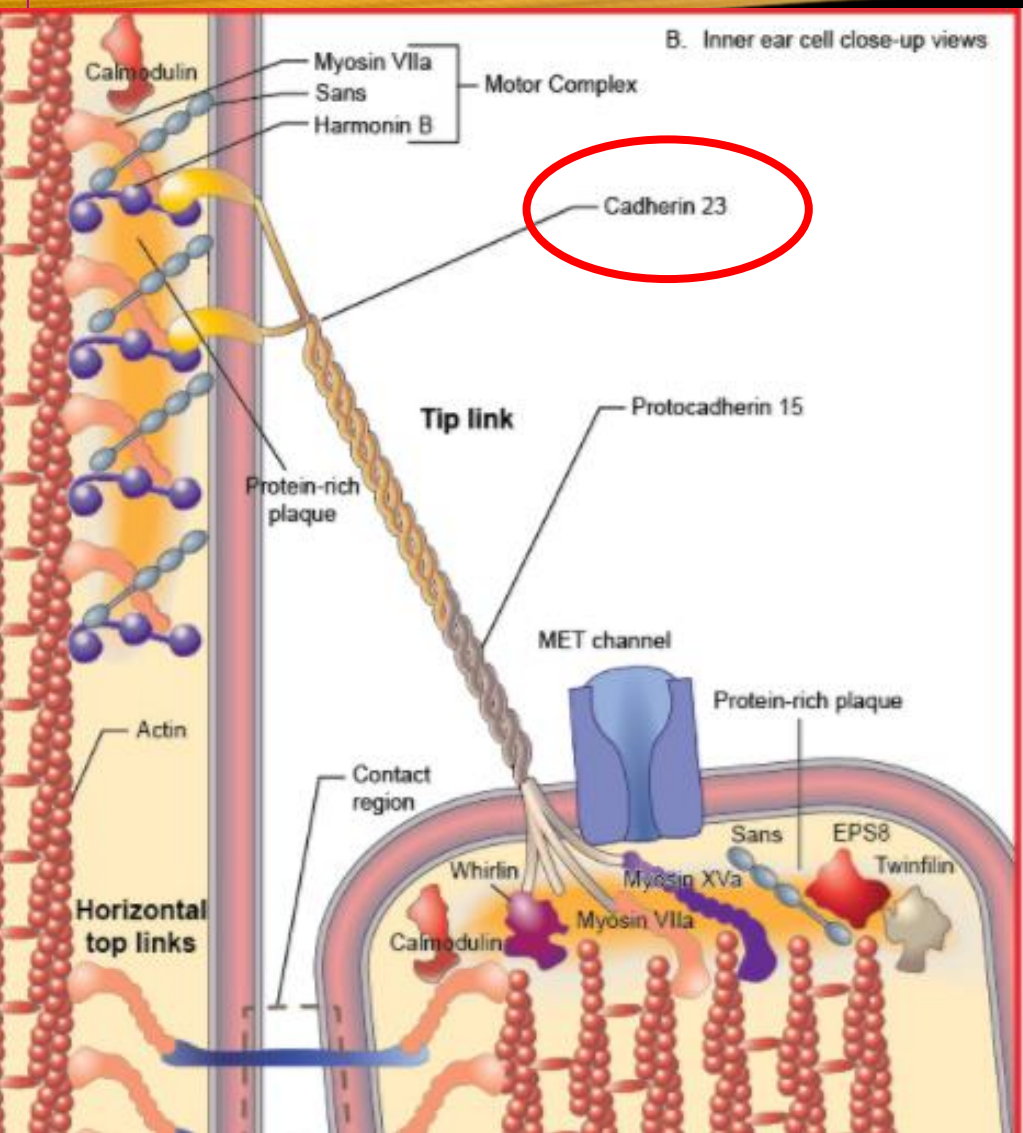
45 variaciones en los 3 genes



★ Se confirma por
secuenciación de SANGER
en todos los miembros de
la familia.

CASO 2

en adulta con SOSPECHA síndrome de USHER



Gene	Type
MYO7A	1B
USH1C	1C
CDH23	1D
PCDH15	1F
SANS/USH1G	1G
CIB2	1J
USH2A	IIA
ADGRV1(GPR98)	
/PDZD7	IIC
WHRN	IID
CLRN1	IIIA
HARS	IIIB

WES
94537 VARIANTS

135 variantes en los
12 genes de USHER



Filtrado y análisis

2 variantes patológicas
★ en **CDH23**

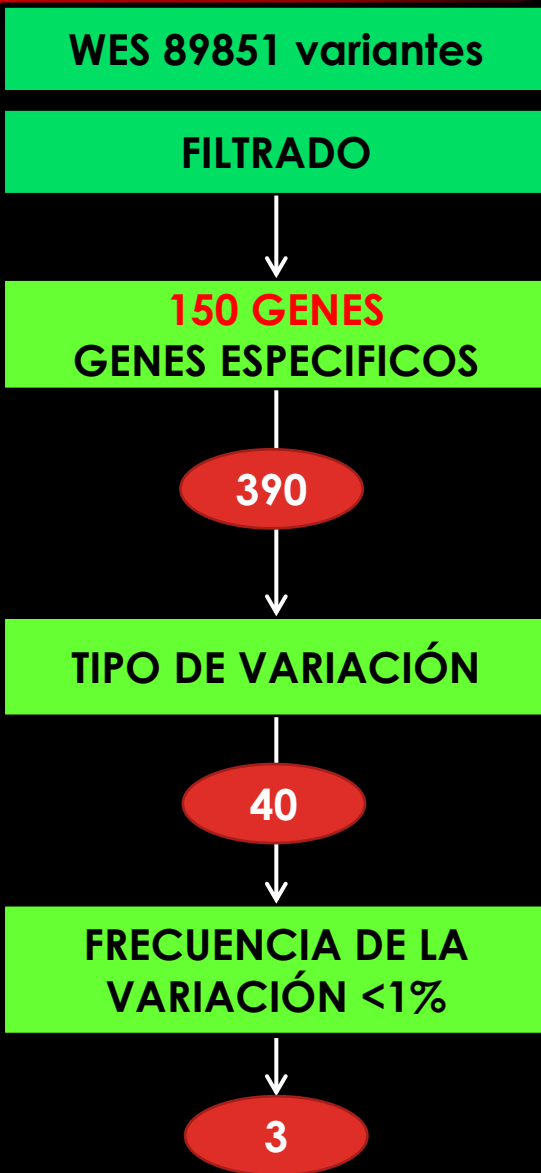
Proteínas truncas
Patogénicas



Se diagnostica con certeza el caso de USHER en la paciente.
Se descarta de riesgo al hermano.

CASO 3

Hipoacusia
MODERADA
POSTLINGUAL
NO SINDRÓMICA

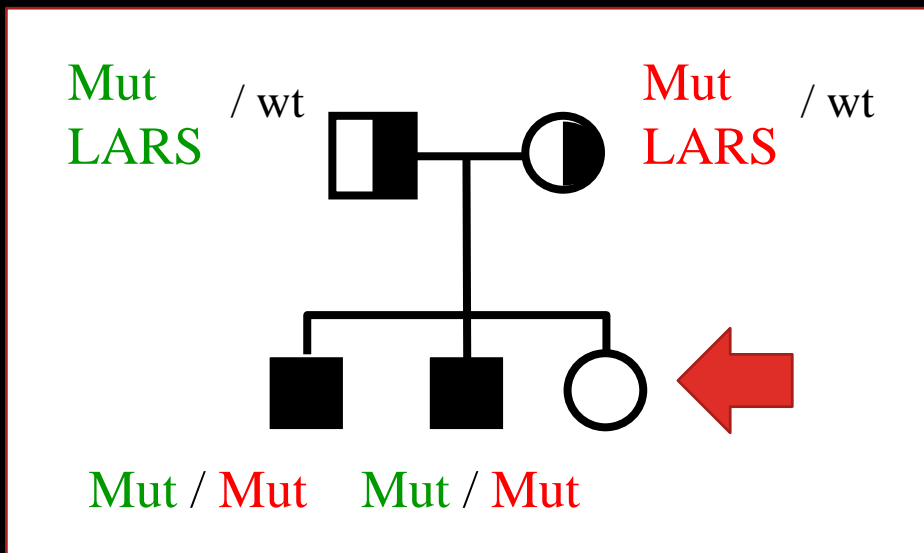


Resultó **FUNDAMENTAL** contar con otros **AFECTADOS** de la familia.

MYO6 ★

Es posible RE-DIAGNOSTICAR al paciente

Hipoacusia No sintrónica
Post-lingual profunda



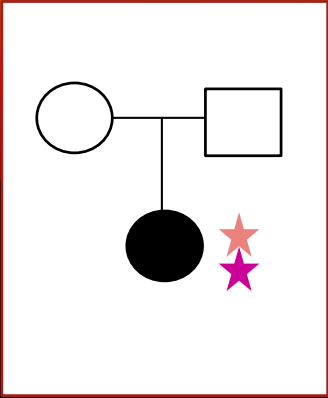
2 MUTACIONES
en el gen
LARS2

Síndrome de Perrault :

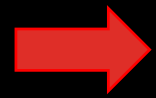
falla ovárica? Infertilidad?

Neuropatía periférica? Ataxia?

CASO 5 Y 6



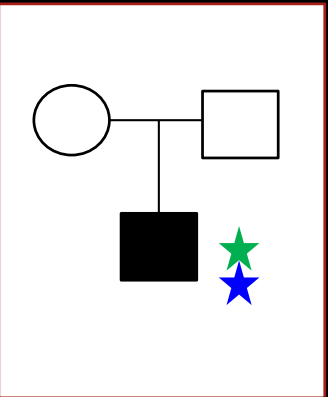
Niña con hipoacusia progresiva,
con implante coclear bilateral.
Sin signos asociados.



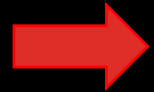
Dos mutaciones patológicas
en el gen **USH2A**

Análisis 1:

genes recesivos
SINDROME de USHER II



Niño con hipoacusia
congénita severa profunda.
Sin signos asociados.



Dos mutaciones patológicas
en el gen **MYO7A**

Análisis 2:

genes dominantes

Análisis 3:

genes síndromicos
SINDROME de USHER I

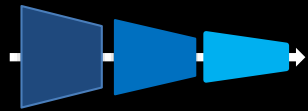
- En **AMBOS** casos se puede **PREDECIR** el desarrollo de la patología y la aparición de signos visuales!
- E instaurar la terapéutica en forma **PRECOZ**

CASO 7

SOSPECHA DE SINDROME DE BOR

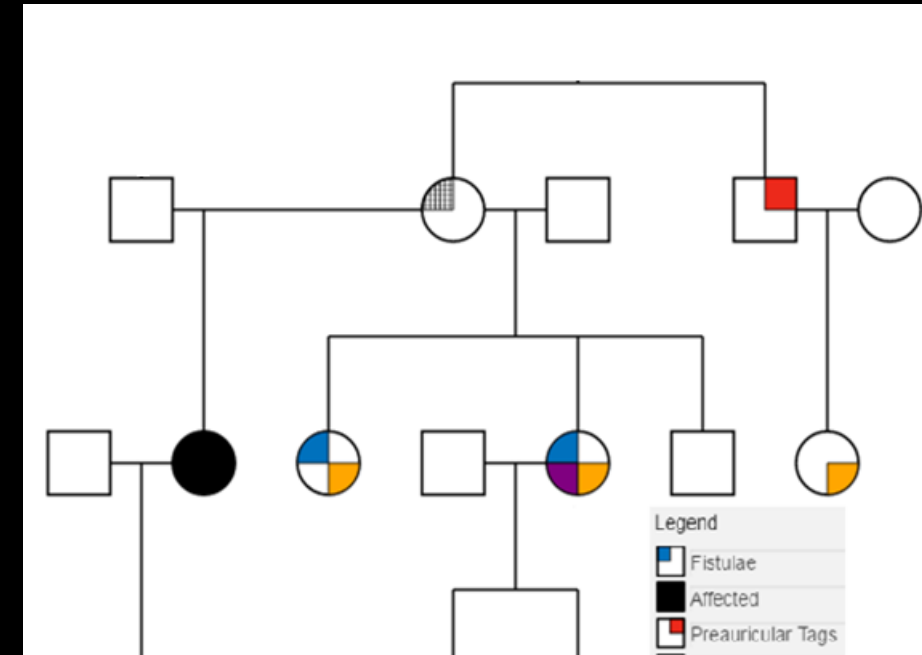
Genes EYA1 - SIX 1 - SIX5

WES: 90534
VARIANTS



0
VARIANTS

Gen	Mutaciones puntuales	Deleciones/ Duplicaciones
EYA1 (40%)	80%	20%
SIX5 (2,5%)	100%	-
SIX1 (2%)	100%	-



Sli.do

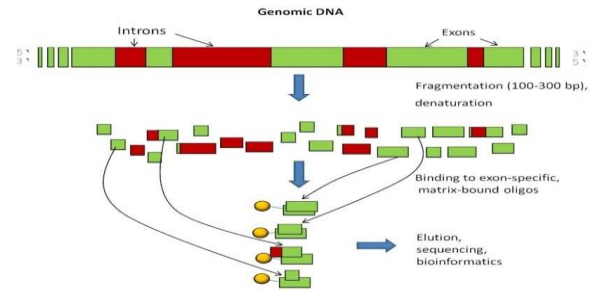
Si no encontramos mutaciones en los genes estudiados... puedo sospechar que no es un BOR?

Si no se detectan mutaciones por secuenciación exómica? Significa que NO es genético?



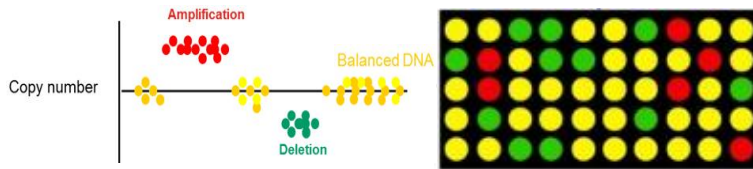
- Mutación en un GEN no estudiado! (Análisis de tríos)
- Mutación en una zona del gen NO estudiada (promotor, intrón, etc...)
- No es una mutación puntual! Necesito OTRA técnica

Secuenciación exómica

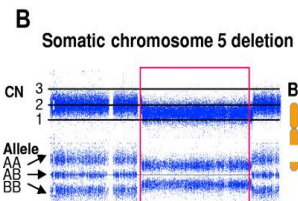


- Para mutaciones puntuales o pequeñas en UN gen.

CGH



Array de SNPs



MLPA



- Generalmente para grandes deleciones o duplicaciones
- Involucra todo un exón o incluso zonas con varios genes

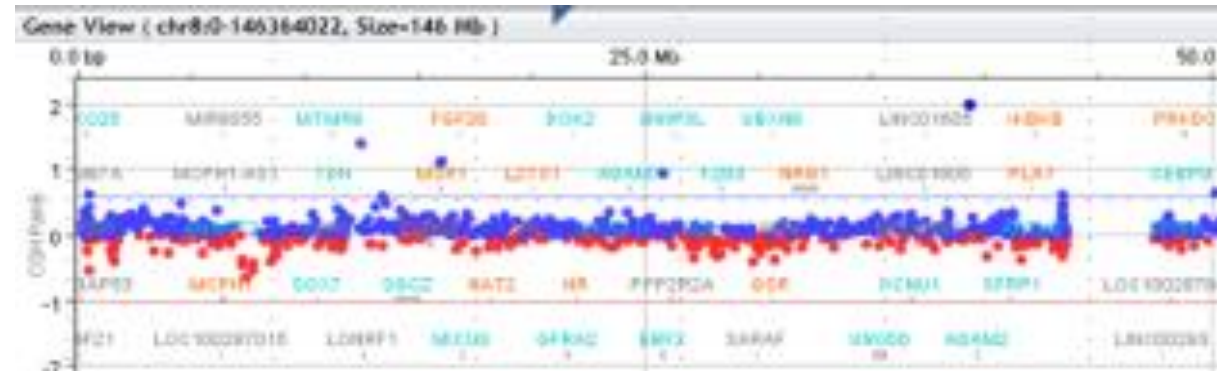
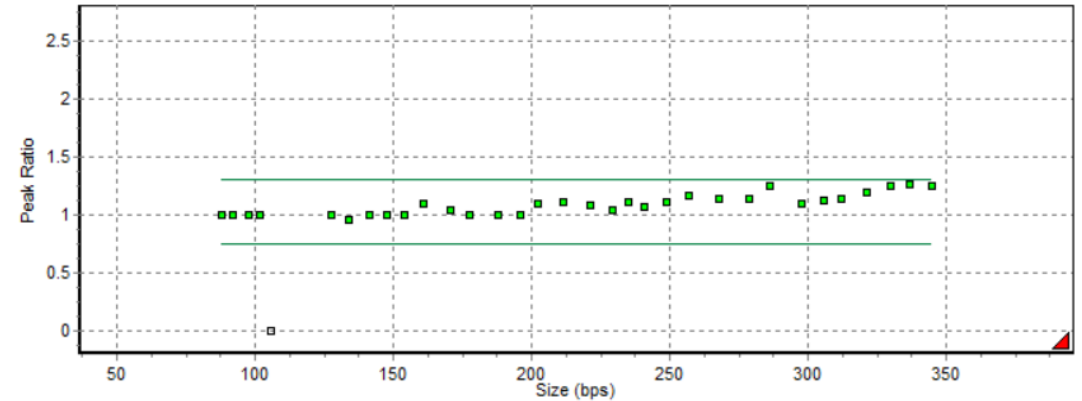
MLPA
(AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS LIGADAS)

CASO 7: BOR

No hay exones
delecionados ni
duplicados en el gen EYA1

CGH
Comparative Genome Hybridization
/Hibridación genómica comparada

No hay zonas delecionadas ni
duplicadas en el cromosoma
8



CASO 7: BOR

Genes EYA1 - SIX 1 - SIX5



0 VARIANTES

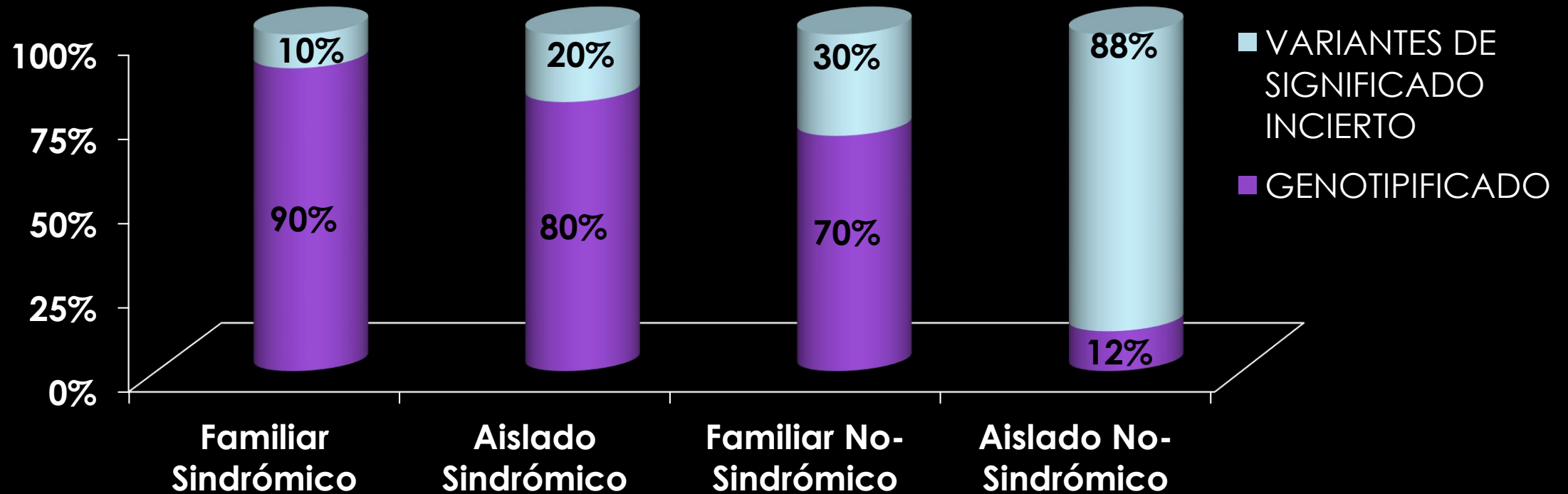
Identificación de NUEVOS GENES relacionados con la patología

Gen	Mutaciones puntuales	Deleciones/ Duplicaciones
EYA1 (40%)	80%	20%
SIX5 (2,5%)	100%	-
SIX1 (2%)	100%	-

RESULTADOS- EXOMA

TASA de EXITO:

- número de genes a analizar (síndromicos)
- familiares afectados para realizar segregación
- fundamental historia clínica completa



CONCLUSIONES

- El estudio de pacientes mediante secuenciación masiva permite abarcar todos los genes relaciones con hipoacusia, encontrar variantes reportadas y nuevas.
- Establecer el diagnóstico genético permite predecir la evolución de la patología, decidir sobre el tratamiento, como así también permitir el asesoramiento genético para futuras generaciones.
- El algoritmo de estudio implementado en nuestro laboratorio resultó EFECTIVO y EXITOSO para estudiar y evaluar a los pacientes con hipoacusia en la ARGENTINA.

Muchas Gracias!

Dra. Viviana Dalamón

vividalamon@gmail.com